




PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C07K 14/475, 16/24, A61K 38/18, 39/395</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/22505</p> <p>(43) 国際公開日 1998年5月28日(28.05.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/04195</p> <p>(22) 国際出願日 1997年11月18日(18.11.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/306056 1996年11月18日(18.11.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友電気工業株式会社 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 越田将悟(KOSHIDA, Shogo)[JP/JP] 〒244 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気工業株式会社 横浜製作所内 Kanagawa, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 請求の範囲の補正の期限前であり、補正書受領の際には再公開される。</p>	
<p>(54)Title: SOLUBLE POLYPEPTIDES</p> <p>(54)発明の名称 可溶性ポリペプチド</p>  <p>(57) Abstract Polypeptides having the effects of accelerating morphogenesis of epithelial cells and proliferation thereof, more specifically a polypeptide specified by the N-terminal sequence of the 1st to 103rd amino acids of a human epimorphin and another polypeptide specified by the N-terminal sequence of the 1st to 104th amino acids of a mouse epimorphin; and medicines containing the same as the active ingredient. These polypeptides are water-soluble and useful as the active ingredients of medicines for treating or preventing diseases accompanied by abnormal morphogenesis, such as inflammatory diseases, burn or wound, and medicines for accelerating hair growth.</p>		

(57) 要約

本発明は、上皮細胞に対して形態形成促進作用や細胞増殖作用を有するポリペプチドであって、ヒト・エビモルフィンのN末端の1番目から103番目のアミノ酸により特定されるポリペプチド、及びマウス・エビモルフィンのN末端の1番目から104番目のアミノ酸により特定されるポリペプチド、並びに該ポリペプチドを有効成分として含む医薬を提供する。係るポリペプチドは、水に可溶であり、形態形成異常を伴う疾患、例えば炎症性疾患、火傷、創傷などの治療や予防のための医薬や、毛成長促進に用いる医薬などの有効成分として有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LTV	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AU	オーストラリア	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
AZ	アゼルバイジャン	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BB	バルバドス	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア共和国	TR	トルコ
BF	ブルキナ・ファソ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BG	ブルガリア	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BJ	ベナン	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CA	カナダ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CG	コンゴ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CH	スイス	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボワール	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CM	カメルーン	KG	キルギス	PT	ポルトガル		
CN	中国	KR	韓国	RO	ルーマニア		
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア		
CY	キプロス	LC	セント・ルシア	SD	スーダン		
CZ	チェコ	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン		
DE	ドイツ	LK	スリランカ	SG	シンガポール		
DK	デンマーク	LS	レソト	SI	スロベニア		
EE	エストニア			SK	スロバキア		
ES	スペイン			SL	シエラ・レオネ		

明細書

可溶性ポリペプチド

技術分野

本発明は、上皮細胞に対して形態形成促進作用や細胞増殖作用を有する新規な可溶性ポリペプチドに関するものである。

背景技術

上皮組織の正常な形態形成は上皮組織の周りに存在する間充織細胞由来の因子による制御されていることが示唆されている。また、上皮組織の形態形成異常に起因する疾患の原因の多くが間充織細胞の異常によるものとされている。係る知見に基づき、間充織細胞による上皮組織の形態形成の制御メカニズムの解明に対して興味もたれている。しかし、上皮組織の形態形成の制御に関与する物質群は複雑な系の中で時間的及び空間的な制御を受けて発現されており、それらの物質を単離して機能を解析することは極めて困難であること、また、上皮組織の形態形成を単純化したモデル実験系を構築することも難しいことなどの理由から、この分野の研究には今日まで大きな進展が見られていない。従って、上皮組織の形態形成に起因する疾患の発症機序の解明や、それらの疾患の治療方法の確立などのために、上皮組織における形態形成の制御メカニズムの解析が強く切望されている。

このような状況下にあつて、上皮組織の形態形成の制御に関与するエピモルフィン (epimorphin) が分離・精製された (特開平6-25295 号公報)。この物質は 277 ないし 289個のアミノ酸からなる蛋白質をコア・蛋白質とする生理活性物質であり、主として間充織細胞により生合成されていることが明らかにされた。また、エピモルフィンは、上皮細胞に作用して上皮組織の形態形成を促進する作用を有していること、並びにエピモルフィンが機能を発揮しない条件では正常な組

組織形成が行われないことも明らかにされた。

また、エピモルフィンの構造的特徴については、エピモルフィン分子が構造上大きく4個のフラグメントに分けられることが見いだされている（欧州特許公開第0698666号）。すなわち、エピモルフィンの全長を構成するポリペプチドは、N末端側より、コイルドコイル領域(1)、機能ドメイン(2)、コイルドコイル領域(3)、及びC末端の疎水性領域に分けることができる。これらのフラグメントのうち、機能ドメイン（ヒト・エピモルフィンではN末端より104番目から187番目のアミノ酸により特定される領域）については、この領域が細胞接着に関与しており、エピモルフィンの生理活性の発現に密接にかかわっていることが示唆されている（上掲欧州特許公開第0698666号）。

エピモルフィンが正常な形態形成を促進する作用を有することから、この物質は、形態形成の異常に起因する疾患などの予防や治療のための医薬や、又は育毛剤などの医薬の有効成分として有用であることが期待される。しかしながら、哺乳類動物から得られた天然型エピモルフィンは生理食塩水などの水性媒体に難溶であり、医薬として実用に供することが困難であった。このため、天然型エピモルフィンの形態形成促進作用を実質的に保持しつつ、溶解性に優れたエピモルフィン誘導体を創製する試みがなされている。例えば、C末端部の疎水性領域を除去した改変体（フラグメント123）などが知られている（特開平6-25295号公報）。

エピモルフィンの部分構造であるコイルドコイル領域(1)については、従来、この領域がエピモルフィンを可溶化させる作用を有することが明らかにされている。しかしながら、エピモルフィンのN末端側からアミノ酸を除去してコイルドコイル領域(1)の一部を除去すると、得られた改変体の細胞接着活性が低下してしまうことも同時に明らかにされた（欧州特許公開第0698666号）。すなわち、この領域の作用については、可溶性の面ではフラグメント(23)の高次構造を変化させる等の作用によりポジティブに働くが、細胞接着活性については機能ドメイン(2)をマスクする等の作用によりネガティブに働くと開示されており、医薬と

しての適用可能性について否定的な示唆がある。なお、エピモルフィンの上記各領域（コイルドコイル領域(1)、機能ドメイン(2)、又はコイルドコイル領域(3)）のそれぞれの生理作用については、細胞接着活性についての報告はあるものの、エピモルフィンに類似の形態形成促進作用については従来知られていない。

発明の開示

本発明の課題は、上皮細胞に対して形態形成促進作用を有する可溶性ポリペプチドを提供することにある。より具体的には、上皮細胞に作用して上皮組織の形態形成を促進し、かつ生理食塩水などの水性媒体に溶解可能なポリペプチドを提供することが本発明の課題である。

また本発明の別の課題は、上記の特徴を有するポリペプチドを有効成分として含み、形態形成因子、例えばエピモルフィンの過少発現に起因する、又は組織又は器官の破壊を伴う疾患の予防及び／又は治療に有用な医薬を提供することにある。さらに本発明の別の課題は、上記の可溶性ポリペプチドを有効成分として含む毛成長促進剤を提供することにある。

本発明者は上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、エピモルフィンを構成するコイルドコイル領域(1) からなるポリペプチドが、水性媒体に溶解可能であり、かつ、上皮細胞に作用して上皮組織の形態形成を促進すること、並びに上皮細胞に対して顕著な細胞増殖促進作用を有することを見いだした。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。ここで、「細胞増殖促進作用」とは、無血清培地で細胞を数日間培養してその生細胞数を増やすことができることを意味するものとする。すなわち本発明は、形態形成促進作用を有するポリペプチドであって、下記のアミノ酸配列(I)（配列表の配列番号 1）：

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg

Lys Asn Asp Asp Gly Asp Thr Val Val Val Val Glu

Lys Asp His Phe Met Asp Asp Phe Phe His Gln Val

Glu Glu Ile Arg Asn Ser Ile Asp Lys Ile Thr Gln
Tyr Val Glu Glu Val Lys Lys Asn His Ser Ile Ile
Leu Ser Ala Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys Glu
Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu Ile Lys Lys Thr
Ala Asn Lys Ile Arg Ala Lys Leu Lys Ala Ile Glu
Gln Ser Phe Asp Gln Asp Glu

により特定されるポリペプチド（本明細書においてこのポリペプチドを「ポリペプチド(I)」という場合がある）を提供するものである。

また、本発明により、形態形成促進作用を有するポリペプチドであって、下記のアミノ酸配列(II)（配列表の配列番号2）：

Met Arg Asp Arg Leu Pro Asp Leu Thr Ala Cys Arg
Thr Asn Asp Asp Gly Asp Thr Ala Val Val Ile Val
Glu Lys Asp His Phe Met Asp Gly Phe Phe His Gln
Val Glu Glu Ile Arg Ser Ser Ile Ala Arg Ile Ala
Gln His Val Glu Asp Val Lys Lys Asn His Ser Ile
Ile Leu Ser Ala Pro Asn Pro Glu Gly Lys Ile Lys
Glu Glu Leu Glu Asp Leu Asn Lys Glu Ile Lys Lys
Thr Ala Asn Arg Ile Arg Gly Lys Leu Lys Ser Ile
Glu Gln Ser Cys Asp Gln Asp Glu

により特定されるポリペプチド（本明細書においてこのポリペプチドを「ポリペプチド(II)」という場合がある）が提供される。

さらに、本発明によれば、上記アミノ酸配列(I) 若しくは(II)において1又は2以上のアミノ酸が置換、付加、及び／又は欠失されたことを特徴とするポリペプチド；天然型エビモルフィンの形態形成促進作用と実質的に同様の形態形成促進作用を有する上記の各ポリペプチド；並びに、さらに細胞増殖促進作用を有する上記の各ポリペプチドも提供される。ここで、「アミノ酸の置換、付加、欠失」

は、例えば部位特異的変位誘発(site-directed mutagenesis)と呼ばれる方法により行うことができる。

本発明の別の態様によれば、上記のポリペプチドを有効成分として含む医薬が提供される。この医薬の好ましい態様として、形態形成因子の過少発現に起因する、又は組織若しくは器官の破壊を伴う疾患の治療及び／又は予防のために用いる医薬；並びに、毛成長促進剤として用いる医薬が提供される。これらに加えて、上記のポリペプチドをヒトを含む哺乳類に投与する工程を含む、形態形成因子の過少発現に起因する、又は組織若しくは器官の破壊を伴う疾患の治療及び／又は予防方法；上記のポリペプチドをヒトを含む哺乳類に投与する工程を含む、エビモルフィンの発現過少に起因する疾患の診断方法；並びに、上記のポリペプチドをヒトを含む哺乳類に投与する工程を含む毛の成長促進方法が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、本発明の上記ポリペプチドを特異的に認識する抗体、好ましくはモノクローナル抗体が提供される。上記抗体の好ましい態様として、上記ポリペプチドに特異的に結合し、上皮細胞に対する上記ポリペプチドの形態形成促進作用を阻害する抗体；並びに、コイルドコイル領域(1)を有するエビモルフィン類に特異的に結合し、上皮細胞に対する上記エビモルフィン類の形態形成促進作用を阻害する抗体が提供される。また、上記抗体を有効成分として含む医薬、好ましくはエビモルフィンの発現過多に起因する疾患の予防及び／又は治療に有用な医薬、並びに、毛成長阻害剤として用いる医薬が提供される。これらに加えて、上記の抗体をヒトを含む哺乳類に投与する工程を含む、エビモルフィンの発現過多に起因する疾患の治療及び／又は予防方法；上記の抗体をヒトを含む哺乳類に投与する工程を含む、エビモルフィンの発現過多に起因する疾患の診断方法；並びに、上記の抗体をヒトを含む哺乳類に投与する工程を含む毛の成長阻害方法が提供される。

図面の簡単な説明

図1は、例2の試験のコントロールとして、MDCKII細胞（腎臓由来細胞株）をDH-mediumのみで培養した細胞の形態を顕微鏡下に撮影した写真である。

図2は、本発明のポリペプチド（15 μ g/ml）の存在下でMDCKII細胞（腎臓由来細胞株）を培養した細胞及び該細胞由来の組織の形態を顕微鏡下に撮影した写真である。

図3は、本発明のポリペプチド（15 μ g/ml）の存在下でMDCKII細胞（腎臓由来細胞株）を培養した細胞及び該細胞由来の組織の形態を、図1及び図2の場合よりもさらに高倍率で顕微鏡撮影した結果を示す写真である。

図4は、例4の試験のコントロールとして、MDCKII細胞（腎臓由来細胞株）をDH-mediumのみで培養した細胞の形態を顕微鏡下に撮影した写真である。

図5は、例4の試験のコントロール（陽性対照）として、ゲル中に本発明のポリペプチド(H1, 3 μ g/ml)を添加してMDCKII細胞（腎臓由来細胞株）を培養した場合の細胞及び該細胞由来の組織の形態を示す写真である。

図6は、ゲル中に本発明のポリペプチド(H1, 3 μ g/ml)及び抗H1抗体(5.2 μ g/ml)を添加してMDCKII細胞（腎臓由来細胞株）を培養した場合の細胞及び該細胞由来の組織の形態を示す写真である。

図7は、ゲル中に本発明のポリペプチド(H1, 3 μ g/ml)及び抗H1抗体(26 μ g/ml)を添加してMDCKII細胞（腎臓由来細胞株）を培養した場合の細胞及び該細胞由来の組織の形態を示す写真である。

図8は、ゲル中に本発明のポリペプチド(H1, 3 μ g/ml)及び抗H1抗体(130 μ g/ml)を添加してMDCKII細胞（腎臓由来細胞株）を培養した場合の細胞の形態を示す写真である。

図9は、ゲル中に本発明のポリペプチド(H1, 3 μ g/ml)及び抗H3抗体(5.2 μ g/ml)を添加してMDCKII細胞（腎臓由来細胞株）を培養した場合の細胞及び該細胞由来の組織の形態を示す写真である。

図10は、ゲル中に本発明のポリペプチド(H1, 3 μ g/ml)及び抗H3抗体(26 μ g/

ml) を添加してMDCKII細胞（腎臓由来細胞株）を培養した場合の細胞及び該細胞由来の組織の形態を示す写真である。

図 1 1 は、ゲル中に本発明のポリペプチド(H1, 3 μ g/ml) 及び抗H3抗体(130 μ g/ml) を添加してMDCKII細胞（腎臓由来細胞株）を培養した場合の細胞及び該細胞由来の組織の形態を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

本発明により提供される上記のポリペプチド(I) は、ヒト・エビモルフィンのN末端の1番目から103番目のアミノ酸により特定されるコイルドコイル領域(1) (欧州特許公開第0698666号) に相当するものである。また、上記ポリペプチド(II)は、マウス・エビモルフィンのN末端の1番目から104番目のアミノ酸により特定されるコイルドコイル領域(1)(上掲欧州特許公開0698666号) に相当している。これらのポリペプチドは、天然型エビモルフィンに比べて水溶性に優れており、蒸留水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などの水性媒体に可溶であることを特徴としている。例えば、このポリペプチドを水性媒体に溶解して 100,000 \times g で 1~2 時間遠心処理しても0.2 mg/ml 以下の濃度であれば実質的に沈殿の生成が認められない。もっとも、本明細書において用いられる「可溶」という用語を上記の特定の溶解性に限定して解釈すべきではない。

また、上記ポリペプチド(I) 又はポリペプチド(II) は、天然型エビモルフィンの上皮細胞に対する形態形成促進作用と実質的に同様の作用を有することを特徴としている。天然型エビモルフィンとは、例えば哺乳類などの間充織細胞によって生合成されるエビモルフィンのことを意味する。天然型エビモルフィンとしては、例えば、ヒト、サル、ウシ、ウマ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウスなどに由来するエビモルフィン、好ましくはヒト由来のエビモルフィンなどを挙げることができる。

天然型のエビモルフィンには、遺伝子のスプライシングにより複数のアイソフ

フォームが存在する場合がある。例えば、ヒト・エピモルフィンについては、特開平6-25295号公報に示されているように288個のアミノ酸からなるヒト・エピモルフィン、並びにそれぞれ287個及び277個のアミノ酸からなるヒト・エピモルフィンのアイソフォームA及びBが存在しており、マウス・エピモルフィンについては、289個のアミノ酸からなるマウス・エピモルフィン、並びにそれぞれ288個及び279個のアミノ酸からなるマウス・エピモルフィンのアイソフォームA及びBが存在している。本明細書において天然型エピモルフィンという場合には、これらのアイソフォーム類をすべて含む概念として用いる。

本発明のポリペプチドには、上記のポリペプチド(I)及びポリペプチド(II)のほか、上記ポリペプチド(I)又はポリペプチド(II)の構成アミノ酸のうちの1個または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されており、これらの構成アミノ酸のうちの1個または2個以上のアミノ酸が欠失しており、及び／又は上記ポリペプチド鎖中に1個若しくは2個以上の任意のアミノ酸が付加された上記ポリペプチド(I)又はポリペプチド(II)のアミノ酸変異体であって、実質的に上皮細胞に対して形態形成促進作用や細胞増殖作用を有するポリペプチドが包含される。置換及び／又は付加される1又は2以上のアミノ酸の種類は特に限定されないが、L-アミノ酸であることが好ましい。

本発明のポリペプチドには、上記のポリペプチド(I)若しくはポリペプチド(II)、又はそのアミノ酸変異体をその部分配列として含み、実質的に形態形成促進作用や細胞増殖作用を有するポリペプチドが包含される。例えば、上記のポリペプチド(I)又はポリペプチド(II)のN末端及び／又はC末端には1個又は2個以上のアミノ酸が結合していてもよく、好ましくは、2個以上の任意のアミノ酸から構成される任意のオリゴペプチドが結合していてもよい。このようなアミノ酸の種類は特に限定されないが、L-アミノ酸から選択されることが好ましい。例えば、上記ポリペプチド(I)又はポリペプチド(II)のN末端に1～10個程度、好ましくは5～7個、特に好ましくは6個のL-ヒスチジンをタグ配列として結合した

ものは、付加したタグ配列に特異的に結合する抗体やニッケル等の物質を用いて簡便に精製、検出できるので、生産効率などの観点から好ましいポリペプチドである。また、親水性や体内安定性を高めるなどの機能性の改善や、形態形成促進作用を高めるなどの目的で特定のタグ配列をポリペプチドに付加することも可能である。その他、特定分子に結合可能なタグ配列を付加することにより、特定の組織又は器官に対するドラッグデリバリー効率を改善した融合蛋白質などを製造することもできる。

上記のポリペプチドは遊離形態であってもよいが、塩酸塩、酢酸塩、若しくはパラトルエンスルホン酸などの酸付加塩、又はアンモニウム塩若しくは有機アミン塩などの塩基付加塩として提供されてもよい。従って、本明細書においてポリペプチドという場合には、上記のような塩の形態のポリペプチドを包含する意味に解釈されるべきである。また、上記の各ポリペプチドに任意の糖類（単糖、二糖、オリゴ糖、若しくは多糖）が結合したものや脂質類などが結合したもののほか、リン酸化されたものも本発明のポリペプチドの範囲に包含される。

本明細書の実施例には、上記可溶性ポリペプチドの好ましい態様であるポリペプチド(I) について、腎臓由来 MDCK II 細胞に対する形態形成促進作用の試験方法が具体的に説明されている。従って、当業者はこれらの試験例を参照しつつ、あるいはこれらの方法に適宜の改変や修飾を加えることにより、上記に定義された各ポリペプチドが所望の形態形成促進作用を有していることを容易に確認することができる。なお、上皮組織に対するエビモルフィンの形態形成の促進作用は、例えば、特開平6-25295 号公報の実施例にも詳細に記載されているので、このような試験系を応用することによっても形態形成促進作用を確認することが可能である。

いかなる特定の理論に拘泥するわけではないが、天然型ヒト・エビモルフィンは、中央フラグメント（機能ドメイン：N末端より104 番目から187 番目のアミノ酸残基により特定されるフラグメント）に存在する細胞接着性領域が上皮細胞

の細胞外表面に存在するエピモルフィン・レセプターに結合することによって上皮細胞表面に固定されるとともに、ポリペプチド(1)を含む領域(天然型のヒト・エピモルフィンのコイルドコイル領域:エピモルフィンのN末端から103番目のアミノ酸残基までの部分)が形態形成に関与するレセプターに結合ないし作用して形態形成作用を発現している可能性がある。

なお、本発明の上記ポリペプチドは、上皮組織に対して天然型エピモルフィンと実質的に同様の形態形成促進作用を有しているが、その作用の強弱は特に限定されない。例えば、天然型のヒト・エピモルフィンと同程度又はそれ以下の濃度で形態形成促進作用を発揮できることが好ましい。なお、本明細書の実施例には形態形成促進作用の代表的試験方法(腎由来細胞に対する管構造形成作用の試験方法)を具体的に記載したが、上記ポリペプチドの形態形成促進作用はこの作用に限定されることはない。また、本発明のポリペプチドは上皮細胞に対して強力な細胞増殖促進作用を有している。従って、本発明のポリペプチドによる達成される形態形成は、細胞の増殖(細胞数の増加)を伴う形態形成であることを特徴としている。本明細書の実施例には本発明のポリペプチドによる細胞増殖促進活性の試験例が開示されているが、本発明のポリペプチドの細胞増殖促進作用はこの試験例により明らかにされた特定の作用に限定されることはない。

なお、天然型エピモルフィンについて数種の形態形成促進作用が報告されているが、それらは天然型エピモルフィンの奏する多様な形態形成促進作用の一部である可能性があることを理解すべきである。従って、形態形成促進作用という用語は、従来報告又は確認されている形態形成促進作用に限定されず、最も広義に解釈する必要がある。また、例えば、形態形成誘導活性、器官・形態形成支持作用などの概念も形態形成促進作用に包含される概念である。さらに、実質的に同様という用語も限定的に解釈すべきではない。本発明のポリペプチドが天然型エピモルフィンの形態形成促進作用に加えて、その作用とは異なる他の形態形成作用を有している場合も本発明の範囲に包含される。

上記ポリペプチドは、ペプチド合成に通常用いられる固相法および液相法などの化学的手法により合成することができる。ペプチド合成におけるアミノ基等の保護基および縮合反応の縮合剤としては、例えば：鈴木絃一編「タンパク質工学－基礎と応用」（1992年，丸善株式会社）；ボンダンスキーら著「ペプタイド・シンセシス」（1976年，John Wiley & Sons, N.Y.）；及びスチュワートら著「ソリッド・フェーズ・ペプタイド・シンセシス」（1969年，W.H. Freeman and Co., San Francisco）等に記載されたものを用いることができる。固相法では市販の各種ペプチド合成装置を利用することができる。また、通常の遺伝子発現操作等の生物学的手法に従って、上記ポリペプチドをコードするDNA 配列を含む組み換えベクターを製造した後、該ベクターにより形質転換された微生物（形質転換体）を調製し、該形質転換体を培養した培養物から所望の上記可溶性ポリペプチドを分離・精製することができる。もっとも、上記可溶性ポリペプチドの製造方法はこれらの化学的方法及び生物学的方法に限定されることはない。

遺伝子発現による製造方法に利用可能なDNA としては、下記塩基配列：

```
ATG CGG GAC CGG CTG CCA GAC CTG ACG GCG TGT AGG
AAG AAT GAT GAT GGA GAC ACA GTT GTT GTG GTT GAG
AAA GAT CAT TTC ATG GAT GAT TTC TTC CAT CAG GTG
GAG GAG ATT AGA AAC AGT ATT GAT AAA ATA ACT CAA
TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT
CTT TCT GCA CCA AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA
GAG CTT GAA GAT CTG AAC AAA GAA ATC AAG AAA ACT
GCG AAT AAA ATT CGA GCC AAG TTA AAG GCT ATT GAA
CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG
```

などを挙げることができる（相補的な塩基配列を省略してセンス鎖のみを示し、配列中、始点が5'末端であり、終点が3'末端である）。

このDNA は、天然型ヒト・エビモルフィンの全長をコードする DNA（特開平6-2

5295 号公報に開示された式(6)で表される核酸配列)のうち、第1番目から第309番目のヌクレオチドまでに相当しており、上記ポリペプチド(I)をコードするDNAである。上記ポリペプチド(II)の製造には、例えば、天然型マウス・エビモルフィンの全長をコードするDNA(特開平6-25295号公報に開示された式(12)で表される核酸配列)のうち、第1番目から第312番目のヌクレオチドにより特定されるDNAを用いることができる。

また、上記のヒト由来のDNA又はマウス由来のDNAを用いて常法によりアミノ酸変異体を容易に製造することが可能である。このような方法としては、例えば、「PCR実験マニュアル」(1991年、HJB出版局)第155～160頁に記載されているリコンビナントPCR法や「実験医学増刊 Vol.8, No.9」(1990年、羊土社)第63～67頁に記載されたPCRを用いた変異遺伝子の作成法などを利用することができる。所望のポリペプチドを製造するために利用可能な遺伝子発現方法としては、例えば、欧州特許公開第0698666号明細書の実施例に詳細に記載された方法を利用することができるが、これらの方法に限定されることはない。

本発明の上記ポリペプチドは、上皮細胞に作用して、上皮性の組織又は器官等の形態形成を促進する作用を有している。従って、本発明のポリペプチドは、内因性の形態形成因子の過少発現などに起因する組織や器官の形態形成の異常を伴う疾患、又は組織又は器官の破壊を伴う疾患の治療及び／又は予防のための医薬あるいは上記疾患の診断のための医薬の有効成分として有用である。また、上記ポリペプチドは、毛成長促進剤として用いる医薬の有効成分としても有用である。本明細書における医薬という用語は、ヒトを含む哺乳類の病気の予防、治療、及び診断に用いるもののほか、通常は医薬部外品として分類される毛成長促進剤や毛成長阻害剤などを含めて最も広義に用いる。

形態形成因子としては天然型エビモルフィンを含めて種々のものが知られている。本発明の医薬は、上記の形態形成因子、特にエビモルフィンの過少発現に起因する組織や器官の形態形成異常を伴う疾患の予防及び／又は治療に有用である。

また、炎症性疾患、癌、火傷、手術、又は創傷、並びにそれらの治癒過程など、上皮性の組織や器官の破壊を伴う疾患（傷害を含む概念として用いる）に対して、上皮組織や器官の再生を促進する目的で本発明の医薬を用いることが可能である。より具体的には、例えば、慢性腎炎などの腎疾患；肺炎、肺気腫、肺結核、慢性閉塞性肺疾患、塵肺、嚥下性肺炎などの慢性及び急性肺疾患；慢性気管支炎などの気管及び気管支疾患；急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、劇症肝炎などの肝疾患；癌；良性前立腺肥大；消化性潰瘍；創傷；皮膚潰瘍などの疾患は、形態形成促進作用を有する他の生理活性物質（例えばHGF やEGF など）によって治療が可能であることが示唆されているので、本発明の医薬はこれらの疾患に対して有効であることが期待される。

さらに、本発明の医薬をエビモルフィンの過少発現に起因する疾患の患者に投与した場合、一般的には該疾患の症状の軽減が認められるので、該疾患を確定診断することができる。本明細書の実施例に具体的に示したように、本発明のポリペプチドは、特に腎細胞に対して強力な細胞増殖作用及び形態形成促進作用を有している。従って、治療に際して腎臓組織、例えば腎尿細管上皮細胞の再生や保護が必要な腎疾患に対して、本発明の医薬を特に好適に用いることができる。例えば、本発明の医薬を、急性糸球体腎炎、急速進行性腎炎、慢性糸球体腎炎などの慢性腎炎、ネフローゼ症候群、慢性腎不全、腎臓ガンなどの腎疾患に適用することが可能である。

本発明の医薬の適用対象は上記に例示した疾患に限定されることはなく、1又は2以上の形態形成因子の発現過少、特にエビモルフィンの発現過少が関与していると考えられる疾患、及び組織や器官の実質的な破壊を伴う疾患に対して適用可能であることを理解すべきである。また、本発明のポリペプチドを有効成分として含む毛成長促進剤の用途は、育毛促進及び発毛促進などを含めて最も広義に解釈すべきである。

本発明の医薬としては、上記のポリペプチドから選ばれる1又は2種以上の物

質をそのまま用いてもよいが、通常は、製剤学的に許容しうる 1 又は 2 種以上の製剤用添加物を用いて上記物質の 1 又は 2 種以上を有効成分として含む医薬組成物を製造し、上記の疾患の治療及び／又は予防のために用いることが好ましい。溶解度、吸収及び排泄などの体内動態、及び／又は製造方法などの観点から、上記のポリペプチドは生理学的に許容される塩の形態であってもよい。上記の医薬組成物の投与経路としては、例えば、静脈内投与、直腸内投与、経口投与などの全身投与の他、外用、点眼、点鼻、点耳、局所注射などの局所投与を挙げることができる。

例えば、静脈内投与用注射剤若しくは点滴剤などの全身投与剤、又は、軟膏、クリーム剤、貼付剤、若しくは局所注射剤などの局所投与剤は本発明の医薬組成物の好ましい形態である。有効成分をリボソームなどに封入した医薬組成物や抗体などを結合した医薬組成物を用いることにより、標的器官に対する親和性や選択性を改善することができる場合がある。もっとも、投与経路は適用対象となる疾患の種類、治療又は予防の目的、患部の種類、患者の状態などに応じて適宜選択可能であり、それぞれの投与経路に好適な製剤形態も適宜選択できることはいうまでもない。診断薬として用いる場合の形態も特に限定されないが、診断方法には本発明の医薬を患者に投与する場合のほか、患者から分離・採取した生体試料を用いて行う場合も包含される。

また、上記のポリペプチドの 1 種又は 2 種以上を有効成分として含む毛成長促進剤は、クリーム剤、噴霧剤、塗布用の溶液剤、又は貼付剤など、毛成長促進剤としての使用目的に好適な形態の製剤として提供されることが好ましい。上記可溶性ポリペプチドは生理学的に許容される塩の形態であってもよく、皮膚のケラチン層を通して有効成分である上記可溶性ポリペプチドを効率的に経皮吸収させるために、適宜の界面活性剤や脂溶性物質などをクリーム剤などに配合することも好適である。なお、本発明のポリペプチドの用途は上記の医薬に限定されることはなく、例えば、細胞培養用の培地に対する添加剤として用いることも可能で

ある。

本発明の第二の態様によれば、本発明のポリペプチド、好ましくは上記ポリペプチド(I) 又は(II)を特異的に認識する抗体、好ましくはモノクローナル抗体が提供される。本発明の抗体は、本発明のポリペプチド（好ましくは上記ポリペプチド(I) 若しくは(II)）、又はコイルドコイル領域(1) を有するエビモルフィン類（好ましくはヒト又はマウス由来の天然型エビモルフィン）に対して特異的に結合することができ、それらの物質の上皮細胞に対する形態形成促進作用を阻害する作用を有している。本明細書においてエビモルフィン類という用語は、天然型エビモルフィン及び天然型エビモルフィンと実質的に同様な生理作用を有する天然型エビモルフィンの改変体（エビモルフィン改変体）、並びに天然型エビモルフィンと実質的に同様な生理作用を有するそれらのアミノ酸変異体を包含する概念で用いる。

本明細書において、エビモルフィン改変体とは、天然型のエビモルフィンと実質的に同様の生理作用（例えば、上皮細胞に対する細胞接着作用と上皮細胞に対する形態形成促進作用）を有するポリペプチドであって、上記の天然型エビモルフィンのポリペプチド配列（通常は277 ないし 289個のアミノ酸からなるポリペプチドである）に由来する部分ポリペプチド配列であるか、又は、天然型エビモルフィンのポリペプチド配列に由来する上記部分ポリペプチド配列をその部分配列として含むポリペプチドのことを意味する。例えば、天然型エビモルフィンのC末端疎水性領域を除去したポリペプチド（特開平6-25295 号公報）はエビモルフィン改変体の代表的化合物である。また、本明細書において、天然型エビモルフィン又はエビモルフィン改変体のアミノ酸変異体とは、天然型のエビモルフィンと実質的に同様の上記生理作用を有するポリペプチドであって、上記天然型エビモルフィン又はエビモルフィン改変体のポリペプチド鎖を構成するアミノ酸のうちの1個または2個以上のアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されており、これらの構成アミノ酸のうちの1個または2個以上のアミノ酸が欠失しており、

及び／又は上記ポリペプチド鎖中に1個若しくは2個以上の任意のアミノ酸が挿入されたものを意味している。

上記公報などに開示されたエビモルフィン改変体のほか、開示された方法に従って、またはそれらに改変ないし修飾を加えた方法によって製造可能なエビモルフィン改変体は、いずれも上記の定義を満足する限り本明細書におけるエビモルフィン改変体に含まれることを理解すべきである。また、天然型エビモルフィン又はエビモルフィン改変体のアミノ酸変異体の製造方法については、例えば、特願平7-175539号明細書及び特願平8-99684号明細書に具体的に説明されているがこれらの方法に限定されることはなく、いかなる方法により製造されたアミノ酸変異体であってもよい。なお、これらのエビモルフィン改変体又はそのアミノ酸変異体の生理活性の検定方法については、特開平6-25295号公報又は国際公開W09/7/40158において詳細に説明された天然型エビモルフィンの生理活性の検定方法に準じて行うことが可能である。例えば、特願平8-102553号明細書の実施例に記載されたマウス胎児肺の気管支の形態形成促進作用や、マウス胎児上顎皮膚の形態形成促進作用などを確認すればよい。

エビモルフィン類に結合してそれらの作用を阻害する抗体として、従来 MC-1 が知られている（特開平6-25295号公報；CELL, 69, pp.471-481, 1992）。本発明の抗体は、上記 MC-1 と同様に、エビモルフィン類による上皮組織の正常な形態形成のメカニズムを明らかにするために有用であり、また、天然型エビモルフィンの発現異常（発現過多）に起因する疾患の発症機序の解明、並びにそれらの疾患の予防及び／又は治療に有用な医薬の有効成分として用いることができる。さらに、本発明の抗体を毛成長阻害剤として用いる医薬の有効成分としても有用である。

本発明の抗体の製造方法の一例として、上記ポリペプチド(II)を用いたポリクローナル抗体の製造方法の詳細を実施例に記載した。従って、本発明のポリペプチドが適宜の条件下においては哺乳類動物に対して抗原として作用することがで

き、通常の方法に従って哺乳類動物を免疫することができること、及び周知かつ慣用の方法に従って、本発明のポリペプチドに包含される任意のポリペプチドを特異的に認識するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を容易に製造できることは当業者に容易に理解されよう。

形態形成因子の1又は2以上の因子の発現過多に起因する疾患としては、例えば、慢性関節リウマチ、腎細胞癌や皮膚癌などの癌、動脈硬化症、膠原病、造血器疾患、腎疾患、前ジストロフィー、骨粗鬆症、神経線維腫症、Sturge-Weber症候群、結晶性硬化症、神経管閉塞障害、分節異常、迷走障害、脳梁形成、脳孔症、及び水頭症などを挙げることができるが、本発明の抗体を有効成分として含む医薬はこれらの疾患の治療及び／又は予防、並びに診断に有用であることが期待できる。

もっとも、本発明の医薬の適用対象はこれらの疾患に限定されることはなく、1又は2以上の形態形成因子の発現過多、特に天然型エビモルフィンの発現過多が関与していると考えられる疾患は全て適用対象となることを理解すべきである。また、上記の抗体を有効成分として含む毛成長阻害剤の用途は、脱毛、育毛阻害、及び発毛阻害などを含めて最も広義に解釈すべきである。なお、本発明の抗体を有効成分として含む医薬は、通常は、製剤学的に許容しうる1又は2種以上の製剤用添加物を用いて医薬組成物として調製されるが、その形態、調製方法、及び医薬組成物の投与経路などは上記の説明したものを応用可能である。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されることはない。

実施例1：本発明のポリペプチドの製造

マウス由来の天然型エビモルフィンのN末端アミノ酸より1～104番目のアミノ酸をコードするDNA配列（特開平6-25295号公報に開示された式(12)で表され

次に、上記の形質転換体を、アンピシリン (50 μ g/ml) を含むLBプレート (1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl, 1.5% Bacto-agar) にまきこみ、生育してくるコロニーを選択して形質転換体を1次スクリーニングした。さらに発現ベクターを有する形質転換体の最終確認として、PCRにより目的のポリペプチドをコードするDNAの有無を確認し (この時点で10ケ中9ケのクローンにDNAが保持されていた)、発現ベクターを有する形質転換体を得た。得られた形質転換体は、アンピシリン (50 μ g/ml) を含む液体LB培地 (1% Bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl) を用いて、37°Cでの振盪培養により大量に増殖させた後、発現を誘導するための物質IPTGを培地中に終濃度 1 mM になるように添加した。その後、37°Cで2時間振盪培養を続け、目的のポリペプチドを大腸菌内で発現させた。発現したポリペプチドの精製は、QIAGEN社のNi²⁺-NTA-Agarose (Cat. No.30230)を用いて添付のプロトコールに従って行った。精製したポリペプチドはSDS-PAGE (CBB 染色) により95%以上の純度を有していることが確認された。また、精製後のポリペプチドのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に対

する溶解度は0.15 mg/mlであった。

実施例2：本発明のポリペプチドのMDCKII細胞（腎臓由来細胞株）に対する形態形成促進作用

実施例1で調製したポリペプチドの器官・形態形成促進作用を以下のようにして評価した。

滅菌したトレフチューブを氷中に立て、トレフチューブに1/10容の10×DH-medium（ダルベッコ変法MEM 培地とハムF12 培地の等量混合培地）、1/10容量の再構成用緩衝液（260 mM NaHCO₃, 200 mM HEPES, 50 mM NaOH）を添加した。さらに、トレフチューブ内に新田ゼラチン製コラーゲン溶液I-P を8/10容量添加し、ピペettingにより混合した。実施例1で製造したポリペプチドをDH-medium に対して透析した後、終濃度が15 μg/mlとなるようにトレフチューブに添加した。コントロールとしては、DH-medium を同量添加した。その後、腎臓由来細胞株 MDC KII 細胞（104cells/well）をトレフチューブに添加して、ピペettingにより混合した。

48ウェルのマルチウェルディッシュに上記混合物を200 μl/wellずつ添加し、37°Cのインキュベーター中で1時間保温して混合物をゲル化させた。無血清のDH-medium を800 μl/wellずつ添加して37°Cで1時間平衡化させた後、ゲルを傷つけないように注意して培地を除いた。続いて、無血清のDH-medium を500 μl/wellずつ添加し、37°Cの 5% 炭酸ガスインキュベーター中で 1～2 週間培養して形態を観察した。

図1ないし図3は2週間培養を行った後の細胞及びその細胞から発生した組織を顕微鏡下に撮影した結果を示した写真である。図1はコントロール（DH-medium のみ）の結果を示し、図2はゲル中に本発明のポリペプチド（15 μg/ml）を添加して培養した結果を示す。図1及び図2の写真は同倍率（40倍）で撮影した結果を示しており、図3はゲル中に本発明のポリペプチド（15 μg/ml）を添加し

て培養したものについて高倍率（100倍）で撮影を行った結果を示している。本発明のポリペプチドをコラーゲンゲル中に添加した場合には細胞(MDCKII)が三次元的に管構造を形成していた。この結果は、本発明のポリペプチドが形態形成促進作用（器官・形態形成支持作用）を有していることを示している。

実施例3：本発明のポリペプチドの調製

マウス由来の天然型エビモルフィンのN末端アミノ酸より 1～104 番目のアミノ酸をコードするDNA 配列に代えて、ヒト由来の天然型エビモルフィンのN末端より 1～103 番目のアミノ酸をコードするDNA 配列（特開平6-25295 号公報に開示された式(6) で表される核酸配列のうち、第1番目から第309番目のヌクレオチドにより特定されるDNA)を用いて、実施例1と同様にして本発明のポリペプチドを製造した。このポリペプチドについて実施例2と同様の試験を行ったところ、このポリペプチドが腎臓由来細胞株 MDCKII 細胞に対して実施例1のポリペプチドと同様の器官・形態形成支持作用を有することが確認された。

実施例4：本発明のポリペプチドに特異的に結合する抗体の作成及び該抗体による形態形成の阻害

実施例1で得たポリペプチド(以下H1とする)、及びコントロールとして形態形成促進作用を有しないマウス由来天然型エビモルフィンの部分ポリペプチド（N末端より189番目から263番目のアミノ酸配列により特定されるポリペプチド）のN末にメチオニンと6個のヒスチジンを付加したポリペプチド(以下H3とする)をそれぞれ用いて、通常の方法に従って（講談社サイエンティフィック、単クローン抗体実験マニュアル、pp.184～188）ラットを免疫し、各々のポリペプチドに対する抗血清を得た。それぞれの血清から、ファルマシア製 HiTrap Protein G (code No.17-0404-01)を用いてIgG 画分を精製してポリクローナル抗体を得た。精製操作は添付のプロトコールに従って行った。得られたポリクローナル抗体を

ウエスタンブロッティングに付し、各々特異性をチェックした後、タイターを合わせて以下の実験に用いた。

本発明のポリペプチドにより腎臓由来細胞株 MDCKII 細胞に管構造が形成される実施例 2 の実験条件を用いて、最終のインキュベーション直前にそれぞれのポリクローナル抗体を無血清の DH-medium (500 μ l/well) 中に添加し、本発明のポリペプチドの形態形成促進作用に及ぼす上記各抗体の影響を調べた。結果を表 1 及び図 4 ないし図 11 に示す。表中、(++) は形態形成が進行したことを示し、(+) は形態形成が 80% 阻害されたことを示し、(-) は形態形成が 100% 阻害されたことを示す。図 4 ないし図 11 は、培養 11 日の細胞及びその細胞から発生した組織を顕微鏡下に撮影した結果を示す写真である。図 4 はコントロール (DH-medium のみ) の結果を示し、図 5 はゲル中に本発明のポリペプチド (H1, 3 μ g/ml) を添加して培養した結果を示す。図 6、図 7、及び図 8 は抗 H1 抗体をそれぞれ 5.2 μ g/ml, 26 μ g/ml, 及び 130 μ g/ml の濃度で添加した場合の結果を示しており、図 9、図 10、及び図 11 は抗 H3 抗体をそれぞれ 5.2 μ g/ml, 26 μ g/ml, 及び 130 μ g/ml の濃度で添加した場合の結果を示している。写真はいずれも等倍率 (40 倍) で撮影した。

表 1

抗体	5.2 μ g/ml	26 μ g/ml	130 μ g/ml
抗 H1 抗体	++	+	-
抗 H3 抗体	++	+	++

これらの結果から明らかなように、抗 H1 抗体は本発明のポリペプチド (H1) の MDCKII 細胞に対する形態形成誘導活性を濃度依存的に阻害するが、抗 H3 抗体は上記

形態形成誘導活性に対する阻害作用を有しない。この事実から、実施例2の実験において観察された形態形成促進作用は、例えば大腸菌の不純物等に由来するものではなく、本発明のポリペプチド(H1)自体の作用に基づくものであることが証明された。さらに、本発明の抗H1抗体がポリペプチドH1のエピモルフィン様形態形成促進作用を効率的に阻害することから、この抗体がエピモルフィンの過剰発現に起因する疾患の治療及び／又は予防のための医薬として有用であることも証明された。

実施例5：細胞増殖に対する本発明のポリペプチドの作用

実施例1で製造した本発明のポリペプチドの細胞増殖に対する効果を以下のよう
に評価した。培地として無血清のDH-medium 又は 0.003~0.15 mg/mlの本発明
ポリペプチドを溶解させた無血清のDH-medium を用い、組織培養用の24ウェルデ
ィッシュに12,000 cells/ml となるようにMDCKII細胞をまきこんだ。37℃の 5%
炭酸ガスインキュベーター中で5日間培養した後、培地を除いてPBS(-)で2回洗
浄した。トリプシン-EDTA で細胞をウェル底から剥がした後、トリパンブルーで
染色して生細胞をカウントした。表2に示したように、MDCKII細胞を無血清培地
で単層培養した場合には、培養液に本発明のポリペプチドを添加しないと5日後
には約1/10に生細胞は減少した（コントロール）。一方、培養液に本発明のポリ
ペプチドを添加した場合は、無血清培養にもかかわらず、添加した本発明ポリペ
プチドの濃度に依存してMDCKII細胞の増殖が誘導された。本発明のポリペプチド
0.075 mg/mlを培養液に添加した場合、5日間培養後には培養開始時に比べて10
倍以上の生細胞が存在することが確認されたが、この結果は 10%牛胎児血清添加
の効果に匹敵するものであり、本発明のポリペプチドが極めて強い細胞増殖活性
を有していることが明らかになった。

表2

=====

ポリペプチド濃度(mg/ml)	培養後細胞数
-----------------	--------

0.15	140,000
0.075	140,000
0.05	90,000
0.0375	83,000
0.03	54,000
0.015	14,000
0.0075	9,800
0.003	5,300
0 (DH-medium)	1,800

=====

培養開始時細胞数： 12,000

産業上の利用可能性

本発明のポリペプチドは生理食塩水などの水性媒体に可溶であり、上皮組織に対する形態形成促進作用を有しているので、形態形成の異常に起因する疾患の予防及び／又は治療に用いる医薬の有効成分などに有用である。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 103

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Met	Arg	Asp	Arg	Leu	Pro	Asp	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Lys	Asn	Asp
1				5					10					15
Asp	Gly	Asp	Thr	Val	Val	Val	Val	Glu	Lys	Asp	His	Phe	Met	Asp
16				20					25					30
Asp	Phe	Phe	His	Gln	Val	Glu	Glu	Ile	Arg	Asn	Ser	Ile	Asp	Lys
31				35					40					45
Ile	Thr	Gln	Tyr	Val	Glu	Glu	Val	Lys	Lys	Asn	His	Ser	Ile	Ile
46				50					55					60
Leu	Ser	Ala	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Ile	Lys	Glu	Glu	Leu	Glu
61				65					70					75
Asp	Leu	Asn	Lys	Glu	Ile	Lys	Lys	Thr	Ala	Asn	Lys	Ile	Arg	Ala
76				80					85					90
Lys	Leu	Lys	Ala	Ile	Glu	Gln	Ser	Phe	Asp	Gln	Asp	Glu		
91				95					100					

配列番号 : 2

配列の長さ : 104

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Met	Arg	Asp	Arg	Leu	Pro	Asp	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Thr	Asn	Asp
1				5					10					15
Asp	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Val	Ile	Val	Glu	Lys	Asp	His	Phe	Met
16				20					25					30
Asp	Gly	Phe	Phe	His	Gln	Val	Glu	Glu	Ile	Arg	Ser	Ser	Ile	Ala
31				35					40					45
Arg	Ile	Ala	Gln	His	Val	Glu	Asp	Val	Lys	Lys	Asn	His	Ser	Ile
46				50					55					60
Ile	Leu	Ser	Ala	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Lys	Ile	Lys	Glu	Glu	Leu
61				65					70					75
Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Glu	Ile	Lys	Lys	Thr	Ala	Asn	Arg	Ile	Arg
76				80					85					90
Gly	Lys	Leu	Lys	Ser	Ile	Glu	Gln	Ser	Cys	Asp	Gln	Asp	Glu	
91				95					100					

配列番号：3

配列の長さ：309

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列

ATG	CGG	GAC	CGG	CTG	CCA	GAC	CTG	ACG	GCG	TGT	AGG	AAG	AAT	GAT	45
GAT	GGA	GAC	ACA	GTT	GTT	GTG	GTT	GAG	AAA	GAT	CAT	TTC	ATG	GAT	90
GAT	TTC	TTC	CAT	CAG	GTG	GAG	GAG	ATT	AGA	AAC	AGT	ATT	GAT	AAA	135

ATA ACT CAA TAT GTT GAA GAA GTA AAG AAA AAC CAC AGC ATC ATT 180
CTT TCT GCA CCA AAC CCG GAA GGA AAA ATA AAA GAA GAG CTT GAA 225
GAT CTG AAC AAA GAA ATC AAG AAA ACT GCG AAT AAA ATT CGA GCC 270
AAG TTA AAG GCT ATT GAA CAA AGT TTT GAT CAG GAT GAG 309

請求の範囲

- 1 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド。
- 2 請求項 1 に記載のアミノ酸配列において 1 個又は 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ上皮細胞に対する形態形成促進作用を有するポリペプチド。
- 3 前記上皮細胞に対する形態形成促進作用が、天然型エビモルフィン様作用である請求項 2 に記載のポリペプチド。
- 4 請求項 2 又は 3 のいずれかに記載のポリペプチドであって、さらに、細胞増殖作用を有するポリペプチド。
- 5 請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドであって、さらに、前記アミノ酸配列のアミノ酸残基が、糖類、脂質類、リン酸基からなる群から選ばれる少なくとも 1 つで修飾されているポリペプチド。
- 6 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを有効成分とする医薬。
- 7 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを有効成分とする、形態形成因子の過少発現に起因する疾患を治療及び／又は予防する医薬。
- 8 前記形態形成因子がエビモルフィンである請求項 7 に記載の医薬。
- 9 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを有効成分とする、組織

若しくは器官の破壊を伴う疾患を治療及び／又は予防する医薬。

1 0 前記疾患が腎疾患である請求項 9 に記載の医薬。

1 1 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを有効成分とする、毛成長促進剤。

1 2 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するポリペプチド。

1 3 請求項 1 2 に記載のアミノ酸配列において 1 個又は 2 個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ上皮細胞に対する形態形成促進作用を有するポリペプチド。

1 4 前記上皮細胞に対する形態形成促進作用が、天然型エピモルフィン様作用である請求項 1 3 に記載のポリペプチド。

1 5 さらに、細胞増殖作用を有する請求項 1 3 又は 1 4 のいずれかに記載のポリペプチド。

1 6 請求項 1 2 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドであって、さらに、前記アミノ酸配列のアミノ酸残基が、糖類、脂質類、リン酸基からなる群から選ばれる少なくとも 1 つと結合するポリペプチド。

1 7 請求項 1 2 ～ 1 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドを有効成分とする医薬。

18 請求項12～16のいずれか1項に記載のポリペプチドを有効成分とする、形態形成因子の過少発現に起因する疾患を治療及び／又は予防する医薬。

19 前記形態形成因子がエピモルフィンである請求項18に記載の医薬。

20 請求項12～16のいずれか1項に記載のポリペプチドを有効成分とする、組織若しくは器官の破壊を伴う疾患を治療及び／又は予防する医薬。

21 前記疾患が骨疾患である請求項20に記載の医薬。

22 請求項12～16のいずれか1項に記載のポリペプチドを有効成分とする、毛成長促進剤。

23 請求項4又は15のいずれか1項に記載のポリペプチドを含む細胞培養培地。

24 請求項1～5、又は12～16のいずれか1項に記載のポリペプチドに対する抗体。

25 請求項24に記載の抗体であって、さらに前記ポリペプチドの形態形成促進作用又は細胞増殖作用を阻害する抗体。

26 請求項24に記載の抗体であって、さらに、コイルドコイル領域(1)を有するエピモルフィン類に特異的に結合し、上皮細胞に対する前記エピモルフィン類の形態形成促進作用又は細胞増殖作用を阻害する抗体。

27 請求項24又は26のいずれか1項に記載の抗体を有効成分とする医薬。

28 エピモルフィン発現過多に起因する疾患を治療又は予防する請求項27に記載の医薬。

29 請求項24又は26のいずれか1項に記載の抗体を有効成分とする毛成長促進剤。

図 1

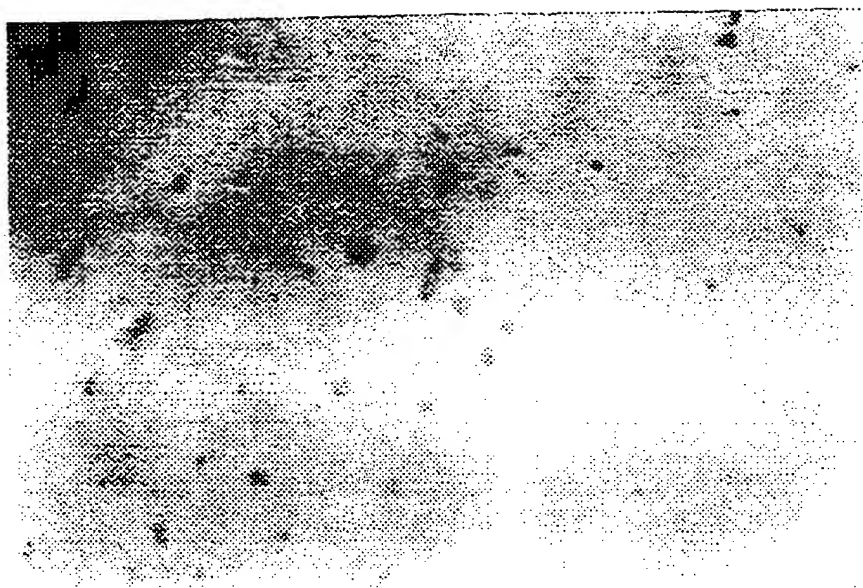


図 2



図 3



図 4

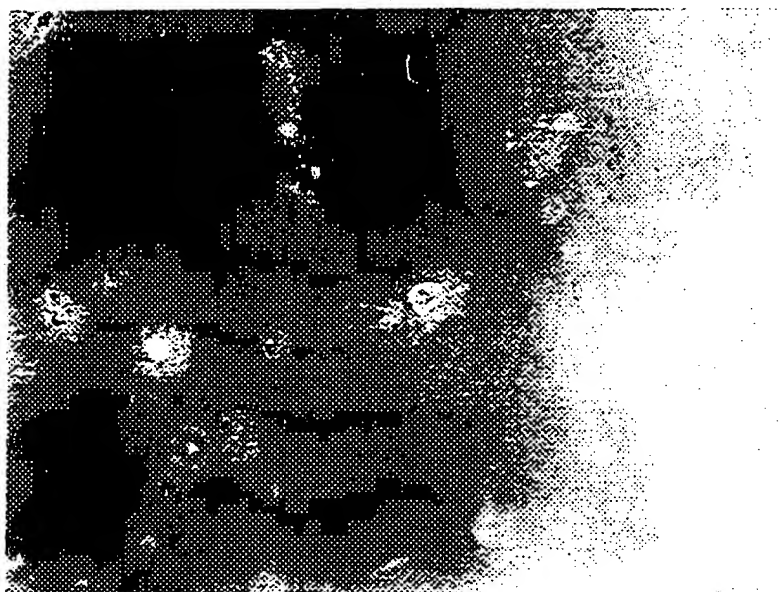


図 5

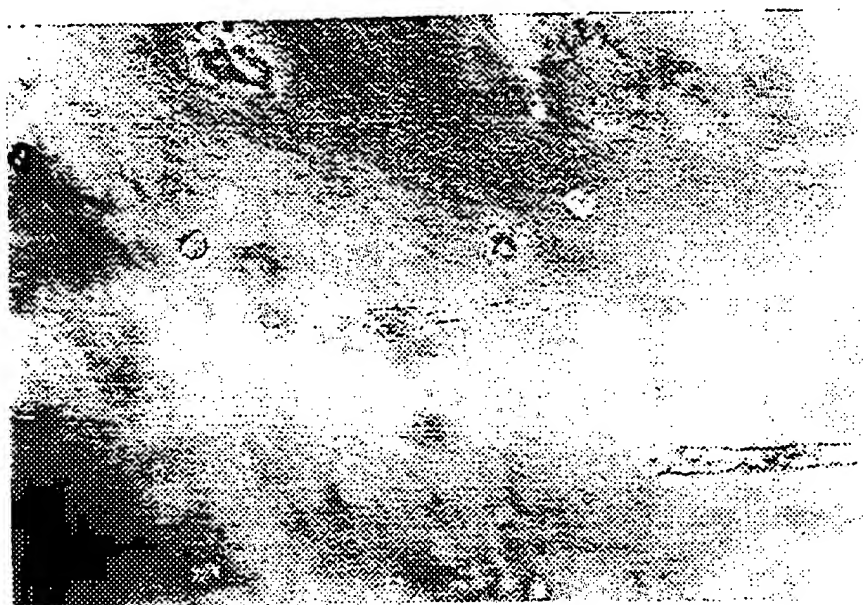


図 6

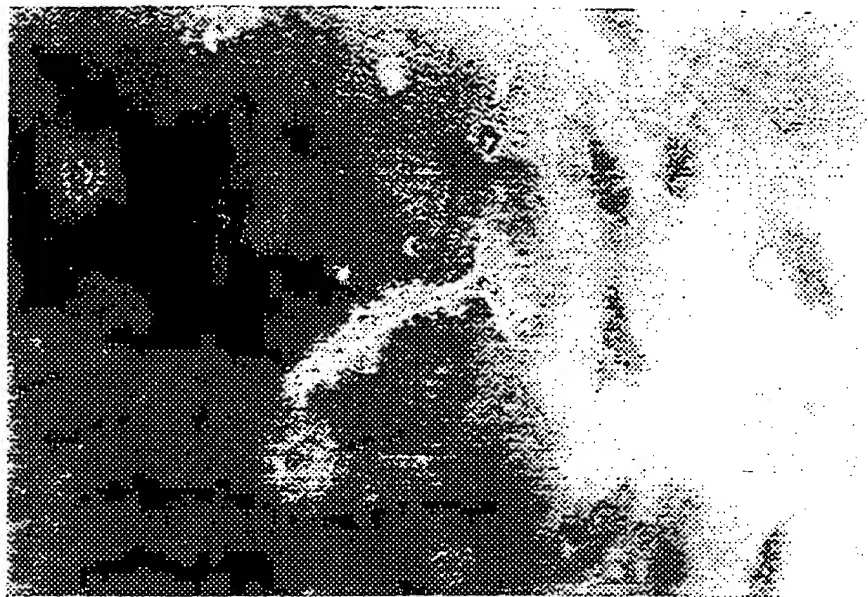


図 7

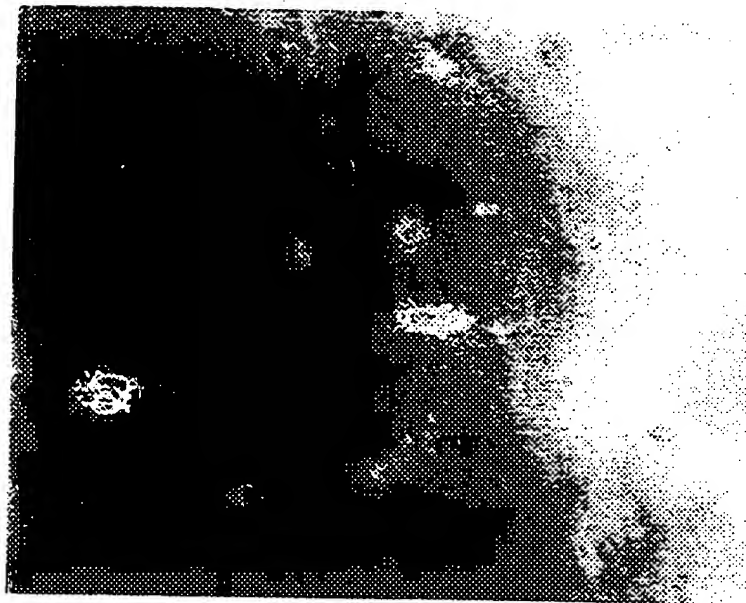


図 8

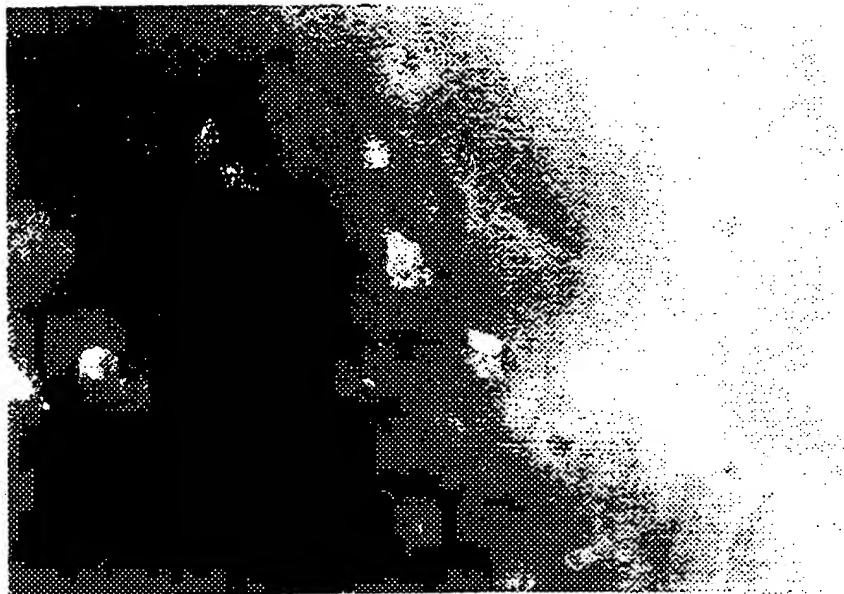


図 9



図10

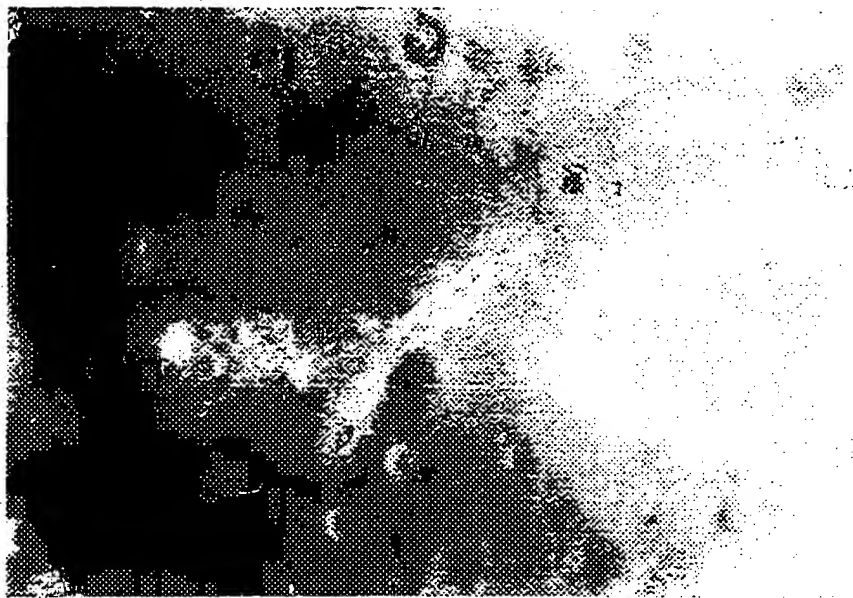
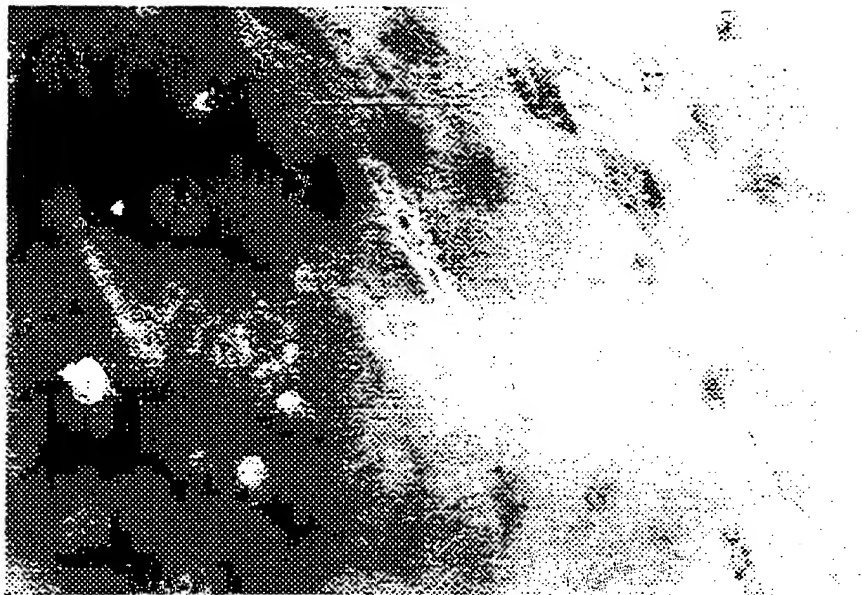


図11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/04195

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C07K14/475, 16/24, A61K38/18, 39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C07K14/47, A61K38/17, 39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-25295, A (Biomaterial Research Institute Co., Ltd.), February 1, 1994 (01. 02. 94), Claims & WO, 93/08213, A1 & EP, 562123, A1	1-29
A	JP, 6-293800, A (Biomaterial Research Institute Co., Ltd.), October 21, 1994 (21. 10. 94), Claims (Family: none)	1-29
A	EP, 698666, A2 (Sumitomo Electric Industries, Ltd.), February 28, 1996 (28. 02. 96), Claims & JP, 8-325293, A & CA, 2152210, A1	1-29

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
March 4, 1998 (04. 03. 98)Date of mailing of the international search report
March 17, 1998 (17. 03. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

A. 発明力に対する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C07K14/475, 16/24, A61K38/18, 39/395

B. 調査を行った分野

調査を行った分野の国際特許分類 (IPC)

Int. Cl. C07K14/47, A61K38/17, 39/395

最小限資料以外、言明で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 6-25295, A (株式会社バイオマテリアル研究所) 1. 2月, 1994 (01. 02. 94), 特許請求の範囲 & WO, 93/08213, A1 & EP, 562123, A1	1-29
A	JP, 6-293800, A (株式会社バイオマテリアル研究所) 21. 10月, 1994 (21. 10. 94), 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-29
A	EP, 698666, A2 (住友電気工業株式会社) 28. 2月, 1996 (28. 02. 96), 特許請求の範囲 & JP, 8-325293, A & CA, 2152210, A1	1-29

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04. 03. 98

国際調査報告の発送日

17.03.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤原 浩子

4H

9155

電話番号 03-3581-1101 内線 3443

